5月 May
2020, 63(5): 574－581

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.05.006

我国草地贪夜蛾田间种群有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂靶标基因 *ace*-1 的基因型和突变频率

李 妍[1,2], 龚丽凤[2], 王欢欢[2], 李 曦[2], 孙 歌[2],
谷少华[2,*], 梁 沛[2], 高希武[2]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 中国农业大学昆虫学系, 北京 100193)

摘要:【目的】对入侵我国的草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂靶标基因 *ace*-1 的基因型进行分子检测,明确抗性基因频率,进而指导田间科学用药。【方法】采集中国 12 省份的草地贪夜蛾田间种群幼虫样本,提取单头样本的基因组 DNA,利用特异性引物进行 PCR 扩增,获得 *ace*-1 基因片段。根据碱基、氨基酸序列比对和测序峰图分析,明确与有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂抗性相关的 3 个氨基酸突变位点 A201S, G227A 和 F290V 的基因型和抗性基因频率。【结果】通过 DNA 检测分析中国 12 省份草地贪夜蛾田间种群 589 头个体 *ace*-1 基因的基因型和突变频率发现,在 A201S 位点检测到 137 头个体为抗性杂合基因型,抗性基因频率为 11.6%,未发现抗性纯合基因型个体;G227A 位点 589 头个体均为敏感纯合基因型;F290V 位点的抗性基因频率最高,达到 57.1%,携带抗性基因的个体数量达到 523 头(占样本总数的 88.8%)。【结论】结果表明入侵我国的草地贪夜蛾种群携带高频率的对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂抗性基因。田间防治建议不用或少用有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂,同时进一步加强田间抗性监测工作。

关键词: 草地贪夜蛾; *ace*-1; 基因型; 抗性基因频率; 有机磷杀虫剂; 氨基甲酸酯类杀虫剂; 抗药性
中图分类号: Q965.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)05-0574-08

Genotype and mutation frequency of *ace*-1, the target gene of organophosphorus and carbamate insecticides, in field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in China

LI Yan[1,2], GONG Li-Feng[2], WANG Huan-Huan[2], LI Xi[2], SUN Ge[2], GU Shao-Hua[2,*], LIANG Pei[2], GAO Xi-Wu[2] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】The objective of this study is to detect the genotype of *ace*-1, the target gene of organophosphorus and carbamate insecticides, in field populations of *Spodoptera frugiperda* in China, and to identify the frequency of resistance genes, so as to provide guidance for the scientific use of insecticides in the field.【Methods】Samples of *S. frugiperda* larvae were collected from maize fields in 12 provinces in China, and the genomic DNA was extracted individually. Then the *ace*-1 gene fragment was cloned using gene specific primers, and the genotype and resistance gene frequency of three amino acid mutation

基金项目: 国家重点研发计划项目"草地贪夜蛾防控关键技术研究与集成示范"(2019YFD0300103); 科技基础资源调查专项"重要作物害虫抗药性基因和敏感基因资源调查"(2018FY101100); 国家自然科学基金项目(31772164)
作者简介: 李妍, 女, 1996 年 4 月生, 安徽宣城人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫毒理及分子生物学, E-mail: shiliyanla@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: gushaohua@cau.edu.cn
收稿日期 Received: 2019-12-11; 接受日期 Accepted: 2020-02-17

sites, A201S, G227A and F290V, were analyzed through base and amino acid sequence alignment, DNA sequencing and peakTrace Basecaller analysis. 【Results】The genotype and mutation frequency of the *ace*-1 gene of 589 individuals of field populations of *S. frugiperda* from 12 provinces in China analyzed through DNA detection method revealed that 137 individuals exhibited resistant heterozygous genotype at locus A201S, and the resistance gene frequency reached 11.6%. Meanwhile, no resistant homozygous genotype was found. At locus G227A, all the 589 individuals displayed susceptible homozygous genotypes. The resistance gene frequency at locus F290V was the highest (57.1%), and there were 523 individuals carrying homozygous or heterozygous resistance genes, accounting for 88.8% of the total samples. 【Conclusion】The results indicate that *S. frugiperda* invading in China carries a high-level frequency of resistance genes to organophosphorus and carbamate insecticides. Organophosphorus and carbamate insecticides should not or less be used in the field control of *S. frugiperda*, and resistance monitoring in fields should be strengthened.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; *ace*-1; genotype; resistance gene frequency; organophosphorus insecticides; carbamate insecticides; insecticides resistance

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*,又称秋粘虫,隶属于鳞翅目(Lepidoptera)夜蛾科(Noctuidae)灰翅夜蛾属 *Spodoptera*,原产于美洲热带和亚热带地区,最早记载于 1797 年,1856 年报道为害棉花,1917 年报道了其防治方法(Murúa *et al*., 2009; 李永平等, 2019)。草地贪夜蛾是一种杂食性重大农业害虫,在美洲记载的寄主植物多达 76 科 353 种,能够对玉米、小麦、水稻、高粱、甘蔗、棉花等作物造成重大产量和经济损失,如可造成美国玉米产量损失 32% (Wiseman and Isenhour, 1993)、尼加拉瓜玉米产量损失 45% (Hruska and Gladstone, 1988)。草地贪夜蛾具有极强的远距离迁飞和扩散能力(吴秋琳等, 2019),2016 年首次报道入侵非洲西部和中部地区,在 2017 年初扩散到非洲南部地区,对当地玉米产量造成多达 21% ~53% 的损失(Abrahams *et al*., 2017)。2019 年 1 月 13 日确认该虫从缅甸入境我国云南省(杨普云等, 2019)。截至 2019 年 9 月 11 日,草地贪夜蛾已经入侵我国 25 个省份的 1 485 个县(市、区),发生面积 104 万 ha,防治面积 157 万 ha(农业农村部种植业管理司种植业快报草地贪夜蛾防控专刊第 26 期)。由于草地贪夜蛾对玉米等主要农作物的暴食危害性和超强迁飞扩散能力,2017 年被国际农业和生物科学中心 CABI 列为世界十大植物害虫之一(https://www.cabi.org/isc/fallarmyworm)。目前草地贪夜蛾已经在北美洲、南美洲、非洲和亚洲四大洲的 100 多个国家发生为害,并且还在继续蔓延扩张,引起了国际社会广泛关注,其暴食性、强迁飞能力、高繁殖力、对化学农药和 Bt 杀虫蛋白易产生抗性的特点也为防控带来了严峻挑战。

有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂由于品种多、活性高、杀虫谱广、成本低等特点,最近几十年一直被用于草地贪夜蛾的防治。但是由于长期过量和不当使用,目前草地贪夜蛾已经对这两类杀虫剂产生了明显抗性。早在 1979 年,美国印第安纳州哈蒙德市的草地贪夜蛾就对氨基甲酸酯类杀虫剂甲萘威产生了 41 倍的抗性,对有机磷类杀虫剂甲基对硫磷和敌百虫分别产生了 113 和 31 倍的抗性(Wood *et al*., 1981)。1981 年美国乔治亚州草地贪夜蛾田间种群对氨基甲酸酯类杀虫剂甲萘威的抗性达 90 倍,并对有机磷类杀虫剂对硫磷和二嗪农有低水平交互抗性(McCord and Yu, 1987);1989 年美国佛罗里达州草地贪夜蛾田间种群对毒死蜱、甲基对硫磷、二嗪农、甲丙硫磷、敌敌畏和马拉硫磷 6 种有机磷类杀虫剂产生了 12 ~271 倍的抗性,同时对灭多威、甲萘威和硫双灭多威 3 种氨基甲酸酯类杀虫剂产生了 14 ~192 倍的抗性(Yu *et al*., 1991);2002 年,佛罗里达北部两块玉米田里采集的草地贪夜蛾幼虫对甲萘威已经产生极高水平抗性,抗性倍数分别为 626 和 1 159倍,对甲基对硫磷分别产生了 30 和 39 倍中等水平抗性(Yu and McCord, 2007);同样是在 2002 年,佛罗里达州斯特拉地区草地贪夜蛾田间种群对甲萘威和甲基对硫磷达到了高抗水平,抗性倍数分别是 562 和 354 倍 (Yu *et al*., 2003); Gutiérrez-Moreno 等(2019)报道波多黎各草地贪夜蛾田间种群对毒死蜱抗性倍数是 47 倍,对灭多威和硫双灭多威的抗性倍数分别达到 223 和 124 倍。由这些报道可以看到草地贪夜蛾对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫

剂产生抗性的速度非常快。

由于草地贪夜蛾化学防治历史比较长，因此多样性的抗药性机制也随之进化，但是主要集中在代谢抗性和靶标抗性两个方面。McCord 和 Yu (1987)在研究草地贪夜蛾对甲萘威抗性机理时发现，细胞色素多功能氧化酶(P450s)的抑制剂增效醚(piperonyl butoxide, PBO)对甲萘威的增效作用可达 15 倍，表明 P450s 可能在抗性产生过程中发挥着重要作用。进一步研究发现，抗性种群对甲萘威氧化降解的速率是敏感种群的 5 倍，说明抗性种群的氧化代谢作用增强是导致其对甲萘威产生抗性的重要机制。Yu (1992)的研究表明，草地贪夜蛾对多种杀虫剂的广谱抗性除与多功能氧化酶、谷胱甘肽-S-转移酶、水解酶和还原酶等解毒酶活性升高有关外，其乙酰胆碱酯酶对敌敌畏等的敏感性也显著下降。目前已有研究证明乙酰胆碱酯酶基因 *ace*-1 的点突变与草地贪夜蛾对有机磷产生抗性有关。如草地贪夜蛾毒死蜱抗性品系的 *ace*-1 基因同敏感品系相比，在 201A, 227G 和 290F 这 3 个氨基酸位点发生了点突变 (Carvalho *et al*., 2013)。Herrera-Mayorga 等(2018)在墨西哥草地贪夜蛾田间种群 *ace*-1 中也发现了 A201S 和 F290V 突变，但未检测到 G227A 突变；此外还检测到 3 个新的突变，但是是否与抗性相关尚不清楚。

由于草地贪夜蛾刚入侵我国，目前我国尚无登记用于防治该虫的杀虫剂，农业农村部根据《农药管理条例》有关规定，推荐了 25 种用于应急防控草地贪夜蛾的药剂(种植业管理司，2019 年 6 月 5 日)，其中有机磷类杀虫剂乙酰甲胺磷为推荐用药之一。在实际防治中，也同时使用其他有机磷类杀虫剂如毒死蜱和氨基甲酸酯类杀虫剂如甲萘威。鉴于在国外草地贪夜蛾防治中，有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂使用时间长、抗性水平高，迫切需要监测入侵我国的草地贪夜蛾田间种群对这两类杀虫剂的抗性基因型及频率。本研究利用 DNA 检测方法检测了 2019 年我国 12 个省市草地贪夜蛾田间种群中有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂靶标基因 *ace*-1 的基因型，明确了抗性基因频率。研究结果在分子水平上揭示了入侵我国的草地贪夜蛾携带有高频率对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂抗性基因，对指导田间合理、科学用药具有重要应用意义。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

草地贪夜蛾田间种群采自我国云南省、广东省、江西省等 12 个省市区，采集信息详见表 1。田间种群个体采集采用随机取样法，每株玉米作为 1 个采样点，只取 1 头幼虫，两个间隔采样点至少距离5 m，每个省份采集幼虫至少 200 头。采集的幼虫活体样本带回实验室，在体视显微镜下根据郭井菲等(2019)描述的草地贪夜蛾形态学特征(头部倒“Y”型纹和第 8 腹节背面 4 个黑点)进行鉴定，确认无误后一部分冻存于 -80℃ 冰箱用于本实验抗性基因分子检测，剩余部分个体用于在实验室建立稳定的种群供其他实验使用。

表 1 中国 12 个省份玉米田草地贪夜蛾采集信息

Table 1 Sampling data of *Spodoptera frugiperda* from maize fields in 12 provinces in China

省份 Provinces	采集地点 Collecting locality	经纬度 Latitude and longitude	采集时间(年-月-日) Collecting date (year-month-day)	样本虫态 Developmental stage of samples
云南 Yunnan	昆明宜良 Yiliang, Kunming	103.15°E, 24.76°N	2019-6-22	4-5 龄幼虫 4th-5th instar larva
广东 Guangdong	广州花都 Huadu, Guangzhou	113.22°E, 23.40°N	2019-6-26	2-3 龄幼虫 2nd-3rd instar larva
江西 Jiangxi	九江永修 Yongxiu, Jiujiang	115.80°E, 29.02°N	2019-6-30	3-4 龄幼虫 3rd-4th instar larva
贵州 Guizhou	安顺 Anshun	105.85°E, 26.16°N	2019-7-3	3-4 龄幼虫 3rd-4th instar larva
安徽 Anhui	安庆宿松 Susong, Anqing	116.12°E, 30.15°N	2019-7-5	3-4 龄幼虫 3rd-4th instar larva
湖南 Hunan	邵阳邵东 Shaodong, Shaoyang	111.73°E, 27.25°N	2019-7-7	3-4 龄幼虫 3rd-4th instar larva
福建 Fujian	福州闽侯 Minhou, Fuzhou	119.13°E, 26.15°N	2019-7-15	4-5 龄幼虫 4th-5th instar larva
四川 Sichuan	绵阳三台 Santai Mianyang	105.06°E, 31.10°N	2019-7-29	3-4 龄幼虫 3rd-4th instar larva
重庆 Chongqing	重庆黔江 Qianjiang, Chongqing	108.77°E, 29.53°N	2019-7-31	2-3 龄幼虫 2nd-3rd instar larva
陕西 Shaanxi	宝鸡眉县 Meixian, Baoji	107.76°E, 34.29°N	2019-8-2	2-3 龄幼虫 2nd-3rd instar larva
江苏 Jiangsu	淮安 Huai'an	119.02°E, 33.62°N	2019-8-14	2-3 龄幼虫 2nd-3rd instar larva
河北 Hebei	邯郸永年 Yongnian, Handan	114.48°E, 36.78°N	2019-9-10	3-4 龄幼虫 3rd-4th instar larva

1.2　*ace*-1 基因 3 个点突变位点的检测

用手术刀切取上述冻存的田间采集的单头幼虫头部或腹部组织 50 mg，采用 TIANamp Genomic DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取幼虫基因组 DNA，幼虫在提取 DNA 之前先饥饿处理 12 h，使其将取食的玉米叶片排泄干净，以避免提取到玉米 DNA 进而导致 PCR 的非特异性扩增。其余步骤参照试剂盒说明书进行。提取的幼虫 DNA 用 NanoDrop 1000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific，Waltham，美国)测定浓度。敏感和抗毒死蜱品系乙酰胆碱酯酶基因 *ace*-1 序列(GenBank 序列号：KC435023 和 KC435024)比对发现有 3 个突变位点，分别是 A201S，G227A 和 F290V (Carvalho *et al*.，2013)。利用 Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International，美国)设计针对这 3 个突变位点的特异性引物 Sfru-ace-1-F：5′-CCTGATGTACCGGGTAATGCTG-3′和 Sfru-ace-1-R：5′-TAACCTTCCTCCGTATTGGATCC-3′。以单头幼虫 DNA 为模板，进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL)：TaKaRa *Ex* Taq 酶(5 U/μL) 0.125 μL，10 × *Ex* Taq Buffer 2.5 μL，dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L)2 μL，正反向引物(10 μmol/L)各 2.5 μL，DNA 模板(200 ng/μL)2.5 μL，无菌水 12.875 μL。反应程序：94℃预变性 3 min；94℃ 1 min，56℃ 1 min，72℃ 45 s，36 个循环反应；最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物由 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测，条带正确的 PCR 产物用基因特异性引物进行 3730XL (Applied Biosystems，美国) DNA 双向测序。

1.3　数据分析

使用 Chromas 2.31 软件对测序峰图进行分析，核对 *ace*-1 编码蛋白在 A201S，G227A 和 F290V 位点对应核苷酸是否发生点突变。Excel 记录统计每个幼虫个体的基因型，计算每个种群的抗性基因频率。抗性基因频率% = [(抗性纯合子个体数/检测总数) + (抗性杂合子个体数/检测总数/2)] × 100%。

2　结果

2.1　草地贪夜蛾乙酰胆碱酯酶基因 *ace*-1 的 3 个突变位点分析

草地贪夜蛾对毒死蜱敏感和抗性品系 *ace*-1 基因序列(GenBank 序列号：KC435023 和 KC435024)(Carvalho *et al*.，2013)比对发现，在抗性品系中发生了 3 个点突变，分别是GCG 突变成TCG(下划线示发生突变的核苷酸，下同)，对应氨基酸由丙氨酸突变成丝氨酸(A201S，以下简称 201)；GGA 突变成 GCA，对应氨基酸由甘氨酸突变成丙氨酸(G227A，以下简称 227)；TTT 突变成GTT，对应氨基酸由苯丙氨酸突变成缬氨酸(F290V，以下简称 290)。

2.2　草地贪夜蛾乙酰胆碱酯酶基因 *ace*-1 基因型和抗性基因频率分析

通过特异性引物 Sfru-ace-1-F 和 Sfru-ace-1-R 扩增得到长度为 500 bp 的 *ace*-1 基因片段(图 1：A)。通过 PCR 扩增和 DNA 测序一共检测了我国 12 个省份的田间种群个体 589 头，通过峰图分析发现，*ace*-1 基因跟有机磷抗性相关的 3 个位点在 589 头个体之间检测出不同的基因型，201 位点有 2 种基因型：敏感纯合型 SS 和抗性杂合型 RS；227 位点在检测样本中均为敏感纯合型 SS；290 位点检测出 3 种基因型：敏感纯合型 SS、抗性杂合型 RS 和抗性纯合型 RR(图 1：B)。

各省份田间种群中，201 位点 63.9% ~88.6% 的个体为敏感纯合子，11.4% ~36.1% 的个体为抗性杂合子，无抗性纯合子，抗性基因频率最低为江苏省 5.7%，最高为四川省 18.0%，12 省份的平均抗性基因频率为 11.4%。227 位点 100% 的个体为敏感纯合子，抗性基因频率为 0。290 位点 3.3% ~57.6% 的个体为抗性纯合子，40.7% ~77.3% 的个体为抗性杂合子，抗性基因频率最低为重庆市 39.2%，最高为江西省 78.0%，12 个省份的平均抗性基因频率为 56.9%。290 位点的抗性基因频率显著高于 201 和 227 位点(表 2)。

3　讨论

有机磷类和氨基甲酸酯类杀虫剂用于防治草地贪夜蛾已经有 30 多年的历史，由于长期不合理用药，导致草地贪夜蛾对多种有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生了抗药性。乙酰胆碱酯酶(AchE，EC 3.1.1.7)点突变导致的对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的不敏感性是导致抗性产生的重要原因(Walsh *et al*.，2001)。在不同种类蚊子中已报道两个乙酰胆碱酯酶 AChE1 和 AChE2，分别由 *ace*-1 和 *ace*-2 基因编码，AChE1 和 AChE2 的突变都会导致昆虫对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性(Chen *et al*.，2007；Kim and Lee，2013；Liu，2015；Wu *et al*.，2015)。巴西种群草地贪夜蛾毒死蜱抗性品系 *ace*-1 基因同敏感品系相比在 201，227 和 290 这 3 个氨基酸位点发生了点突变，其中 201 位点的

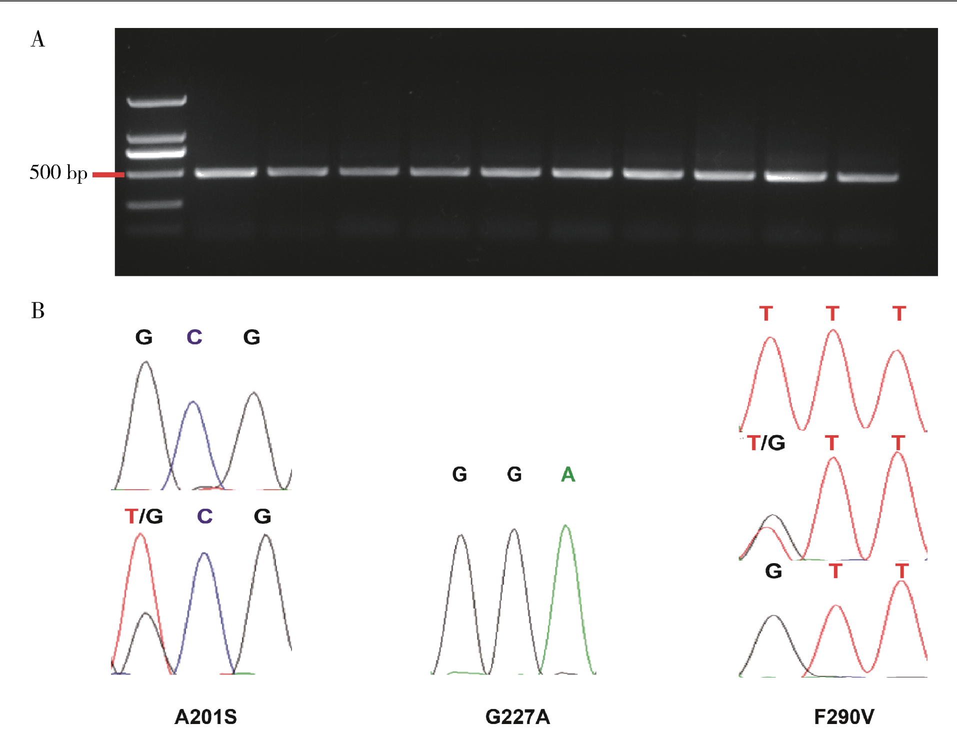


图 1 草地贪夜蛾 *ace*-1 基因突变位点分析

Fig. 1 Analysis of *ace*-1 gene mutation sites in *Spodoptera frugiperda*

A: 用特异性引物随机克隆的 10 个个体 *ace*-1 PCR 产物 PCR products of *ace*-1 gene of 10 randomly selected individuals using gene specific primers; B: 草地贪夜蛾 *ace*-1 基因突变位点分型图 Genotyping of *ace*-1 gene mutation sites in *S. frugiperda*.

抗性基因最低,为 17.5%,仅检测到 1 头纯合突变个体;227 和 290 位点的抗性基因频率较高,分别为 67.5% 和 32.5%(Carvalho *et al*., 2013)。墨西哥草地贪夜蛾田间种群 *ace*-1 基因检测结果显示,在田间采集的 40 头个体中 201 位点发生了 12.5% 的纯合抗性突变;227 位点没有发现杂合或纯合突变个体,100% 为纯合敏感基因型 SS;290 位点发生了 50% 的突变,其中 25% 纯合突变,25% 杂合突变(Herrera-Mayorga *et al*., 2018)。本研究在检测的我国 12 省份 589 头个体中,201 位点有 137 头个体(23.3%)为抗性杂合个体,没有发现抗性纯合个体。同墨西哥种群检测结果一样,在 227 位点 100% 为敏感纯合个体,没有发现杂合或纯合抗性个体,表明入侵我国的草地贪夜蛾种群本就不携带这种突变,而入侵之后也没有发生该位点的突变。在我国草地贪夜蛾 589 头个体中,290 位点的抗性基因频率最高,携带抗性基因的个体数量达到 523 头(占样本总数的 88.8%),其中 373 头个体(63.3%)携带抗性杂合 RS 基因,150 头个体(25.5%)携带抗性纯合 RR 基因(表 2)。巴西、墨西哥和我国草地贪夜蛾种群 *ace*-1 基因型和抗性基因频率的差异可能是由于个体接触的杀虫剂种类和选择压不同导致的。但是值得注意的是,从检测数量上来说,本研究的 589 头个体要远远多于巴西种群的 20 头和墨西哥的 40 头,所得结论能够更加真实反映目前我国不同省份草地贪夜蛾田间种群 *ace*-1 的基因型以及抗性基因频率。

另外,除了 A201S, G227A 和 F290V 3 个突变位点,近期在墨西哥种群中报道了 3 个新的突变位点 g-396 G/A, g-498 A/G, g-768 C/G (Herrera-Mayorga *et al*., 2018),但是经分析这不是 3 个新的突变位点,而是正常的核苷酸多态性现象,因为这 3 个核苷酸位点的突变,并没有引起对应编码的氨基酸发生改变(g-396 G/A 位点 CCG 突变成 CCA,但是编码的氨基酸不变,都是脯氨酸;g-498 A/G 位点 GAA 突变成 GAG,但是编码的氨基酸不变,都是谷氨酸;g-768 C/G 位点 GTC 突变成 GTG,但是编码的氨基酸不变,都是缬氨酸)。本研究对我国 12 个种群 589 头个体的 *ace*-1 测序峰图分析没有发现新的突变位点。Carvalho 等(2013)在检测的 20 头毒死蜱抗性品系个体中有 8 头在 227 和 290 这 2 个位点以抗性杂合基因型形式共同出现,另有 1 头在 201 和 227 位点以抗性纯合型共同出现。本研究检测结果显示,589 头个体在 227 位点均为敏感纯合型,同 Herrera-Mayorga 等(2018)对墨西哥种群的检测结果相一致;有 137 头在 201 位点为抗性杂合型(表 2),

表 2　2019 年中国 12 个省份玉米田中采集的草地贪夜蛾幼虫的 *ace*-1 靶位点 A201S，G227A 和 F290V 的基因型及频率

Table 2　Genotype and frequency of the *ace*-1 target sites, A201S, G227A and F290V in *Spodoptera frugiperda* larvae collected from maize fields in 12 provinces in China in 2019

省份 Provinces	样本量 Sample size	A201S 位点基因型 Genotype at locus A201S			抗性基因频率(%) Resistance gene frequency	G227A 位点基因型 Genotype at locus G227A			抗性基因频率(%) Resistance gene frequency	F290V 位点基因型 Genotype at locus F290V			抗性基因频率(%) Resistance gene frequency
		SS	RS	RR		SS	RS	RR		SS	RS	RR	
云南 Yunnan	70	58(82.9)	12(17.0)	0 (0)	8.6	70(100)	0(0)	0(0)	0	8(11.4)	42(60.0)	20(28.6)	58.6
广东 Guangdong	57	41(71.9)	16(28.1)	0(0)	14.0	57(100)	0(0)	0(0)	0	5(8.8)	44(77.2)	8(14.0)	52.6
贵州 Guizhou	54	41(75.9)	13(24.1)	0(0)	12.0	54(100)	0(0)	0(0)	0	9(16.7)	27(50.0)	18(33.3)	58.3
江西 Jiangxi	59	46(78.0)	13(22.0)	0(0)	11.0	59(100)	0(0)	0(0)	0	1(1.7)	24(40.7)	34(57.6)	78.0
福建 Fujian	52	43(82.7)	9(17.3)	0(0)	8.7	52(100)	0(0)	0(0)	0	6(11.5)	32(61.5)	14(26.9)	57.7
四川 Sichuan	61	39(63.9)	22(36.1)	0(0)	18.0	61(100)	0(0)	0(0)	0	5(8.2)	44(72.1)	12(19.7)	55.7
重庆 Chongqing	60	41(68.3)	19(31.7)	0(0)	15.8	60(100)	0(0)	0(0)	0	15(25.0)	43(71.7)	2(3.3)	39.2
江苏 Jiangsu	44	39(88.6)	5 (11.4)	0(0)	5.7	44(100)	0(0)	0(0)	0	1(2.0)	34(77.3)	9(20.4)	59.1
湖南 Hunan	40	30(75.0)	10(25.0)	0(0)	12.5	40(100)	0(0)	0(0)	0	2(5.0)	26(65.0)	12(30.0)	62.5
安徽 Anhui	29	23(79.3)	6(20.7)	0(0)	10.3	29(100)	0(0)	0(0)	0	3(10.3)	15(51.7)	11(38.0)	63.8
陕西 Shaanxi	27	20(74.1)	7(25.9)	0(0)	13.0	27(100)	0(0)	0(0)	0	5(18.5)	19(70.4)	3(11.1)	46.3
河北 Hebei	36	31(86.1)	5(13.9)	0(0)	6.9	36(100)	0(0)	0(0)	0	6(16.7)	23(63.9)	7(19.4)	51.4

SS：敏感型纯合子 Susceptible homozygote；RS：抗性杂合子 Resistant heterozygote；RR：抗性纯合子 Resistant homozygote. 括号中数值为基因型所占百分比 Values in brackets are the percentage of genotypes.

其中有 127 头(92.7%)在 201 和 290 位点同时以抗性杂合型出现,推测在 201 位点为抗性杂合基因型的个体,其在 290 位点通常也会产生杂合突变;有 150 头在 290 位点为抗性纯合型(表 2),其中有 149 头(99.3%)在 201 位点同时为敏感纯合型,推测在 290 位点为抗性纯合基因型的个体,其在 201 位点通常不会发生杂合或纯合突变。上述 3 个位点的规律性突变特点可以作为我国草地贪夜蛾有机磷和氨基甲酸酯靶标基因 *ace*-1 突变快速检测的参考依据,具有重要的现实意义。

根据迁飞习性、气象学数据和迁飞轨迹模拟发现,目前草地贪夜蛾是通过东、西两条路径入侵我国的,东线主要从越南、老挝、泰国进入广东广西两省,然后依靠强劲的西南风向北入侵长江流域和华北玉米主产区省份;西线主要从缅甸进入云南,然后经贵州进入重庆、四川和陕西(Li *et al*., 2019)。东西两条线草地贪夜蛾迁飞速度不同,加上各省份用药种类和频率也有不同,最终会导致抗性产生速度不同。在西线上的云南、贵州、重庆和四川 4 个省份,201 位点的抗性基因频率呈现出依次升高的趋势,而 290 位点的抗性基因频率在西线 5 省上无明显差异(表 2),这可能是这两个位点在药剂选择压下的突变速率不同导致。在东线上的广东、江西、福建、江苏、湖南和安徽 6 个省份,201 和 290 这两个位点的抗性基因频率无明显规律特征(表 2),可能跟草地贪夜蛾借助强劲的西南风快速随机北迁,药剂选择压不强相关。

化学杀虫剂作为害虫防治的"压舱石"和"杀手锏",对 2019 年成功防治草地贪夜蛾发挥了至关重要的作用。由于我国转基因玉米还没有商业化种植,所以未来几年防治草地贪夜蛾化学杀虫剂还将会扮演主要角色。但是我们应该清楚地看到,一方面,入侵我国的草地贪夜蛾种群本身就携带高频率的抗性基因;另一方面,我国不同省份之间用药种类和用药频率有很大差异,害虫产生抗药性的速度和水平也会不同,所以根据我国不同省份种植模式、用药种类和频率,展开不同省份草地贪夜蛾田间种群抗药性监测和治理工作就显得尤为重要(李永平等, 2019; 吴益东等, 2019)。本研究通过检测全国 12 省份的草地贪夜蛾 589 头个体 *ace*-1 基因型和抗性基因频率,发现跟有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂抗性相关的 3 个突变位点(第 201, 227 和 290 位氨基酸)中有两个(201 和 290 位点)存在不同频率的突变,尤其是 290 位点的突变频率最高,达到了 57.1%。表明入侵中国的草地贪夜蛾携带高频率的抗性基因,同时进入我国后再经过杀虫剂的多轮选择作用,推测已经对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生了较高的抗性。在实际田间防治中,应该不用或尽量少用有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂。有报道表明,甲氨基阿维菌素苯甲酸盐、乙基多杀菌素、氯虫苯甲酰胺、甲维盐等对草地贪夜蛾均有非常强的杀虫活性(王勇庆等, 2019; 尹艳琼等, 2019; 赵胜园等, 2019),在田间防治中可以优先使用,但同时也要加强抗性监测,以检测草地贪夜蛾对这些药剂是否产生抗药性。

最后需要指出的是,除了靶标基因发生点突变,解毒酶的活性增强也是草地贪夜蛾对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂产生抗性的重要原因。在巴西草地贪夜蛾毒死蜱抗性品系中发现 P450s, GSTs 和 CXEs 基因表达量上升(Carvalho *et al*., 2013);对草地贪夜蛾基因组分析发现,P450s 和 GSTs 两大解毒代谢酶基因家族发生了严重扩张,这可能是草地贪夜蛾高杂食性和易对化学农药产生抗性的原因之一(Liu *et al*., 2019)。因此,对入侵我国的草地贪夜蛾对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的代谢抗性机制也有待进一步加强研究。

参考文献(References)

Abrahams P, Bateman M, Bateman M, Beale T, Clottey V, Cock M, Colmenarez Y, Corniani N, Day R, Early R, Godwin J, Gomez J, Moreno PG, Murphy ST, Oppong-Mensah B, Phiri N, Pratt C, Richards G, Silvestri S, Witt A, 2017. Fall armyworm: impacts and implications for Africa. *Outlooks Pest Manag*., 28(5): 196 - 201.

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C, 2013. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS ONE*, 8(4): e62268.

Chen M, Han Z, Qiao X, Qu M, 2007. Resistance mechanisms and associated mutations in acetylcholinesterase genes in *Sitobion avenae* (Fabricius). *Pestic. Biochem. Physiol*., 87(3): 189 - 195.

Guo JF, Jing DP, Tai HK, Zhang AH, He KL, Wang ZY, 2019. Morphological characteristics of *Spodoptera frugiperda* in comparison with three other lepidopteran species with similar injury characteristics and morphology in cornfields. *Plant Prot*., 45(2): 7 - 12. [郭井菲, 静大鹏, 太红坤, 张爱红, 何康来, 王振营, 2019. 草地贪夜蛾形态特征及与 3 种玉米田为害特征和形态相近鳞翅目昆虫的比较. 植物保护, 45(2): 7 - 12]

Gutiérrez-Moreno R, Mota-Sanchez D, Blanco CA, Whalon ME, Terán-Santofimio H, Rodriguez-Maciel JC, DiFonzo C, 2019. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to

synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *J. Econ. Entomol.*, 112(2): 792－802.

Herrera-Mayorga EV, Bello-Ruiz DG, Paredes-Sánchez FA, Segovia-Tagle V, García-Aguirre KK, Lara-Ramírez EE, Rivera G, 2018. Identification of SNP′s in the *ace*-1 gene of *Spodoptera frugiperda* associated with resistance to organophosphorus insecticide. *Southwest. Entomol.*, 43(4): 855－865.

Hruska AJ, Gladstone SM, 1988. Effect of period and level of infestation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, on irrigated maize yield. *Fla. Entomol.*, 71(3): 249－254.

Kim YH, Lee SH, 2013. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(1): 47－53.

Li XJ, Wu MF, Ma J, Gao BY, Wu QL, Chen AD, Liu J, Jiang YY, Zhai BP, Early R, Chapman JW, Hu G, 2019. Prediction of migratory routes of the invasive fall armyworm in eastern China using a trajectory analytical approach. *Pest Manag. Sci.*, 76(2): 454－463.

Li YP, Zhang S, Wang XJ, Xie XP, Liang P, Zhang L, Gu SH, Gao XW, 2019. Current status of insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* and strategies for its chemical control. *Plant Prot.*, 45: 14－19. [李永平, 张帅, 王晓军, 解晓平, 梁沛, 张雷, 谷少华, 高希武, 2019. 草地贪夜蛾抗药性现状及化学防治策略. 植物保护, 45(4): 14－19]

Liu H, Lan TM, Fang DM, Gui FR, Wang HL Guo W, Chen XF, Chang Y, He S, Lyu LH, Sahu SK, Cheng L, Li HM, Liu P, Fan GY, Liu TX, Hao RS, Lu HR, Chen B, Zhu SS, Lu ZH, Huang FN, Dong W, Dong Y, Kang L, Yang HM, Sheng J, Zhu YY, Liu X, 2019. Chromosome level draft genomes of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest in China. *BioRxiv*, doi: http://dx.doi.org/10.1101/671560.

Liu N, 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.*, 60: 537－559.

McCord E, Yu SJ, 1987. The mechanisms of carbaryl resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 27(1): 114－122.

Murúa MG, Molina-Ochoa J, Fidalgo P, 2009. Natural distribution of parasitoids of larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Argentina. *J. Insect Sci.*, 9: 20.

Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL, Williamson MS, 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem. J.*, 359(1): 175－181.

Wang YQ, Ma QL, Tan YT, Zheng Q, Yan WJ, Yang S, Xu HH, Zhang ZX, 2019. The toxicity and field efficacy of chlorantraniliprole against *Spodoptera frugiperda*. *J. Environ. Entomol.*, 41(4): 782－788. [王勇庆, 马千里, 谭煜婷, 郑群, 闫文娟, 杨帅, 徐汉虹, 张志祥, 2019. 氯虫苯甲酰胺对草地贪夜蛾的毒力及田间防效. 环境昆虫学报, 41(4): 782－788]

Wiseman BR, Isenhour DJ, 1993. Fall armyworm symposium: response of four commercial corn hybrids to infestations of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla. Entomol.*, 76(2): 283－292.

Wood KA, Wilson BH, Graves JB, 1981. Influence of host plant on the susceptibility of the fall armyworm to insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 74(1): 96－98.

Wu QL, Jiang YY, Hu G, Wu KM, 2019. Analysis on spring and summer migration routes of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) from tropical and southern subtropical zones of China. *Plant Prot.*, 45(3): 1－9. [吴秋琳, 姜玉英, 胡高, 吴孔明, 2019. 中国热带和南亚热带地区草地贪夜蛾春夏两季迁飞轨迹的分析. 植物保护, 45(3): 1－9]

Wu SW, Zuo KR, Kang ZK, Yang YH, Oakeshott JG, Wu YD, 2015. A point mutation in the acetylcholinesterase-1 gene is associated with chlorpyrifos resistance in the plant bug *Apolygus lucorum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 65: 75－82.

Wu YD, Shen HW, Zhang Z, Wang XL, Shi Y, Wu SW, Yang YH, 2019. Current status of insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* and counter measures to prevent its development. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 56(4): 599－604. [吴益东, 沈慧雯, 张正, 王兴亮, 施雨, 武淑文, 杨亦桦, 2019. 草地贪夜蛾抗药性概况及其治理对策. 应用昆虫学报, 56(4): 599－604]

Yang PY, Zhu XM, Guo JF, Wang ZY, 2019. Strategy and advice for managing the fall armyworm in China. *Plant Prot.*, 45(4): 1－6. [杨普云, 朱晓明, 郭井菲, 王振营, 2019. 我国草地贪夜蛾的防控对策与建议. 植物保护, 45(4): 1－6]

Yin YQ, Zhang HM, Li YC, Tian WK, Yang YJ, Luo R, Li XY, Zhao XQ, Liu Y, Wang Y, Chen FS, Chen AD, 2019. Laboratory toxicity of eight insecticides against *Spodoptera frugiperda* from different areas in Yunnan. *Plant Prot.*, 45(6): 70－74. [尹艳琼, 张红梅, 李永川, 田维逵, 杨毅娟, 罗嵘, 李向永, 赵雪晴, 刘莹, 王燕, 陈福寿, 谌爱东, 2019. 8 种杀虫剂对云南不同区域草地贪夜蛾种群的室内毒力测定. 植物保护, 45(6): 70－74]

Yu SJ, 1991. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 39(1): 84－91.

Yu SJ, 1992. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 85(3): 675－682.

Yu SJ, McCord EJr, 2007. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidopera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidopera: Yponomeutidae). *Pest Manag. Sci.*, 63(1): 63－67.

Yu SJ, Nguyen SN, Abo-Elghar GE, 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 77(1): 1－11.

Zhao SY, Sun XX, Zhang HW, Yang XM, Wu KM, 2019. Laboratory test on the control efficacy of common chemical insecticides against *Spodoptera frugiperda*. *Plant Prot.*, 45(3): 10－14. [赵胜园, 孙小旭, 张浩文, 杨现明, 吴孔明, 2019. 常用化学杀虫剂对草地贪夜蛾防效的室内测定. 植物保护, 45(3): 10－14]

（责任编辑：赵利辉）